

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657115

研究課題名(和文) RNAサイレンシング機構の細胞内1分子解析

研究課題名(英文) In cell single-molecule analysis of the RNA silencing mechanism

研究代表者

佐々木 浩 (Sasaki, Hiroshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30611454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉やマイクロRNAによる遺伝子抑制に代表されるRNAサイレンシングは、遺伝子発現を制御するシステムとして真核生物に広く保存されています。このシステムの中核を担うのが、Argonauteタンパク質と1本鎖RNAからなる複合体RNA-induced silencing complex (RISC)です。しかし、RISCがつくられる詳しいメカニズムについては、いまだ謎に包まれています。本研究では、全反射蛍光顕微鏡による1分子イメージングという手法を用いて、RISCが作られる過程を可視化することを目指しました。そして、RISC形成の基本過程を明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：RNA silencing, such as RNA interference and gene silencing by microRNAs, is a gene regulation system universally conserved in eukaryotes. The RNA-induced silencing complex, which is composed of an Argonaute protein and a single-stranded RNA, plays a central role in this system. However, the detailed mechanisms of RISC assembly remained elusive. In this project, by single-molecule imaging approach using total-internal reflection microscopy, I have tried to visualize how RISC is assembled, and revealed the fundamental steps in RISC assembly.

研究分野：1分子イメージング

キーワード：RNA 1分子イメージング RNAサイレンシング 核酸 RISC Argonaute 複合体形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 18-30塩基長程度の小分子 RNA (small RNA) が、相補的な配列を持つ標的遺伝子の発現抑制を行う RNA サイレンシングと呼ばれる機構は、真核生物に広く保存されており、発生、分化、細胞増殖、稔性、がん化など、多様な生命現象を緻密に制御していることが明らかとなりつつある。small RNA は一般に、自身と相補的な配列をもつ RNA を標的として働く。しかし、small RNA はそれ自身だけで標的 RNA を調節できるわけではなく、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれる複合体を形成して、初めて機能することができる。RISC を構成するタンパク質の中でも中心的な役割を担うのが、Argonaute (Ago) である。Ago は small RNA と直接結合し、標的 mRNA の切断や翻訳の抑制、poly(A) 鎖の短縮とそれに伴う標的 mRNA の分解など、多岐に渡る転写後翻訳制御を誘導することが明らかとなっている。

(2) 近年の研究から、RNA サイレンシング機構を担う RNA-induced silencing complex (RISC) や RISC-loading complex (RLC) といった複合体の解明が進み、RISC の構成因子あるいは形成に必要な因子として Ago 以外にも、Dicer や R2D2, Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリータンパク質などが同定された。しかし、RISC 形成過程の中間状態を生化学的に単離することができないため、中間状態の結合・解離過程や構造変化など、RISC assembly の各素過程について、生化学的にこれ以上解析することは不可能な状況であった。また、構造生物学の進展により、複数の Ago タンパク質・RNA 複合体構造が決定されていたが、RNA を含まない Ago タンパク質については決定されておらず、複数の中間状態の立体構造を決定することで、RISC assembly を解明するというアプローチは実現性に乏しかった。そのため、これらの因子がどのように会合し

て機能的な複合体を形成するか、その順序と構造変化の詳細については未知であった。特に、Ago がどのように構造変化し、small RNA 二本鎖を取り込むかは明らかとなっていなかった。また、RLC や RISC の構成因子がどの順序で会合し、RNA を受け渡し、解離するのか、その順番も謎に包まれていた。さらに、in vivo での RISC assembly に関する知見は皆無であった。

2. 研究の目的

(1) RISC の in vitro 完全再構成系を用いた生化学と1分子イメージングの技術を組み合わせることで、これまでの方法では捉えることができなかった RISC assembly の分子ダイナミクスを試験管内そして最終的に細胞内で可視化し、統合的に理解することを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 生化学的に最も解析が進んでいるショウジョウバエ Ago2 をモデル Ago として用いた。まず RISC が形成される過程を全反射顕微鏡下で解析できる in vitro 1 分子イメージング系を構築した。リガンドと共有結合する Halo タンパク質を融合タグとして用いて、S2 細胞で発現させた Ago2 タンパク質を基板上に固定化し、組換えタンパク質として調製した Dicer-2/R2D2, Hsc70/Hsp90 シャペロンマシナリー、さらにそれぞれの 3'末端に異なる蛍光標識を導入した RNA2 本鎖を加えた。

(2) 60 分間の反応後に基板上を洗った上で、基板上を観察すると、RISC の再構成に必要な因子がすべて揃っている時のみ、基板上に残る輝点が観察された。さらに、Ago2 がもつ酵素活性依存的にパッセンジャー鎖に対応する輝点が消失した。この結果、1 分子イメージング環境下で形成される RISC が、これまでの生化学的な検証と合致することを確認

した。

(3) 次に、構築した RISC の 1 分子イメージング系を用いて、基板上で RISC が形成される過程を 20 分間にわたってリアルタイムで観察した。そして、複数の実験条件において RNA2 本鎖が Ago2 上に滞在する時間を解析し、RISC 形成に必要な各因子の寄与と作用点を調べた。

4. 研究成果

(1) Dicer-2/R2D2/siRNA2 本鎖の複合体が、シャペロンマシナリー非依存的に Ago2 に結合解離を繰り返すこと、そしてシャペロンマシナリーの存在により、Dicer-2/R2D2/siRNA2 本鎖複合体の Ago2 への結合が安定化され、滞在時間が延びることを明らかにした。さらに、Ago2 によるガイド鎖 5'-末端に位置するリン酸基の認識は、繰り返される結合解離のステップ以降に起きることが分かった。

(2) これらの事実を統合することで、従来の生化学的解析では捉えることができなかった、ショウジョウバエ Ago2-RISC 形成における複数の基本過程を解明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Shintaro Iwasaki, Hiroshi M. Sasaki, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki, Hisashi Tadakuma, & Yukihide Tomari. Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature*. 査読有。オンライン掲載 2015 年 3 月 31 日。doi: 10.1038/nature14254.

(2) Hiroshi M. Sasaki & Yukihide Tomari. The core of RNA silencing revealed. *Nature structural & molecular biology*. 査読無。vol. 19, pp 657-660 (2012). doi: 10.1038/nsmb.2302.

[学会発表](計 4 件)

(1) Hiroshi M. Sasaki. Defining fundamental steps in the assembly of *Drosophila* RNAi enzyme complex. Cell Symposia: Regulatory RNA. ポスター発表。査読有。10/20/2014. Berkeley, CA, USA.

(2) Hiroshi M. Sasaki. Defining fundamental steps in the assembly of *Drosophila* RNAi enzyme complex. 口頭発表(招待講演)。Tokyo RNA club. 12/17/2013. Tokyo.

(3) 佐々木浩。全反射顕微鏡によるショウジョウバエ RNAi 酵素複合体形成の基本過程の解明。ポスター発表。査読有。第 51 回日本生物物理学会年会。10/28/2013。京都。

(4) Hiroshi M. Sasaki. Single-molecule analysis of RISC assembly. The 8th Microsymposium on Small RNA. ポスター発表。査読有。5/27/2013. Vienna, Austria.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

研究者番号：

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) RNAi の謎に 1 分子観察で迫る | UTokyo Research

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/unlocking-the-mystery-of-RNAi-at-single-molecule-resolution.html>

(2) RNAi の謎に 1 分子観察で迫る—複合体「RISC」がつくられる過程を分子レベルで解明 | 分子細胞生物学研究所 プレスリリース
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/pressrelease150327.html>

(3) RNA interference In A Test Tube
<http://www.asianscientist.com/2015/04/in-the-lab/rna-interference-test-tube/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 浩 (SASAKI, Hiroshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30611454

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()